

10/089014 #2  
PCT/JP00/02049

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

30.03.00

REC'D 26 MAY 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

EU

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年11月19日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第329045号

出 願 人

Applicant(s):

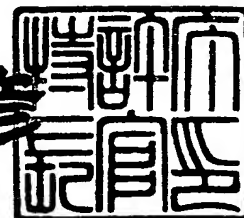
工業技術院長

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 5月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3032698

【書類名】 特許願

【整理番号】 11900303

【提出日】 平成11年11月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/52

【発明の名称】 シロイヌナズナ由来のG D P - 4 - ケト - 6 - デオキシ  
- D - マンノース - 3, 5 - エピメラゼ - 4 - レダク  
ターゼ遺伝子

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

【氏名】 仲山 賢一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技術院 生命工学  
工業技術研究所内

【氏名】 地神 芳文

【特許出願人】

【識別番号】 000001144

【氏名又は名称】 工業技術院長 梶村 皓二

【指定代理人】

【識別番号】 220000404

【氏名又は名称】 工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 シロイヌナズナ由来のGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 配列番号 2 で表される塩基配列を含む、請求項 2 記載のDNA。

【請求項 4】 請求項 2 又は 3 に記載のDNAを含む発現ベクター。

【請求項 5】 請求項 4 記載の発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 6】 請求項 5 記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物からGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼを採取することを特徴とするGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼの製造方法。

【請求項 7】 請求項 4 記載の発現ベクター及びGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼをコードするDNAを含む発現ベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項 8】 請求項 7 記載の形質転換体を用いてGDP-D-マンノースをGDP-

L-フコースに変換する方法。

【請求項 9】 請求項 7 記載の形質転換体を、GDP-D-マンノースと共に培地に培養し、得られる培養物から GDP-L-フコースを採取することを特徴とする GDP-L-フコースの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、GDP-L-フコース合成に関与する酵素の遺伝子に関し、より詳細には、シロイヌナズナ由来の GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子、及び該遺伝子を利用する GDP-L-フコースの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖タンパク質などの糖鎖は、生体において非常に重要な働きをしていることが明らかとなっており、このことから、糖鎖の構造を自在に変換するための糖鎖工学が重要な技術分野となってきた。現在糖鎖を改変する技術としては、化学合成により目的の糖鎖を合成したものをタンパク質に結合させる化学的手法、細胞内の糖鎖合成遺伝子を遺伝子工学の手法を用いて改変する、あるいは糖タンパク質を生産する宿主を変えて生産する生物学的手法、糖鎖合成酵素を用いる糖鎖合成法などがある。

【0003】

化学的手法では、大量合成の手法に道が開けてきてはいるが、糖鎖の複雑性から、いまだに全ての種類の糖鎖を簡単に供給するには至っていない。一方、生物学的手法では、遺伝子工学の発展により、糖鎖合成関連遺伝子の発現を制御することが可能となったため、糖鎖の改変は可能となってきたが、全ての糖鎖について均一に合成することは困難であり、常に種類の異なった糖鎖が混在しているのが現状である。

【0004】

これに対して、糖鎖合成酵素を用いた生体外での糖鎖合成は、均一な構造の糖

鎖合成には非常に有用であり、特に生物学的手法と組み合わせると、均一で、大量の糖鎖の生産が可能となる。

しかしながら、この生体外での糖鎖合成では、糖ヌクレオチドが糖転移酵素の糖供与体として必須であるところ、この糖ヌクレオチドは非常に高価であるので、この方法を大量生産に用いることは困難となっている。糖ヌクレオチドは、生体内に微量でしか存在せず、かつ、高エネルギー結合で結ばれた非常に反応性に富む不安定な物質であるので、各生物におけるその産生量があまり多くなく、大量に生産することが困難であるのが原因である。

#### 【0005】

近年、バクテリアを用いた生産系により、比較的多種類の糖ヌクレオチドの大量生産系が実用的なものへ近づいてきており、その供給は安定する方向へ向かっている。しかしながら、このバクテリアを用いる系では、2種の微生物を混合して、なおかつ、細胞中に含まれる一方の原料を他方の細胞中に送り込むために細胞を破壊した状況で生産を行うことから、ある程度反応過程の長いものでは生産量はそれほど多くなく、新たな手法の開発が求められている。

#### 【0006】

糖ヌクレオチドのうち、GDP-L-フコースはフコース転移酵素の糖供与体としてフコースを含んだ糖鎖合成を行う際には必須のものである。このフコース残基の付加した糖鎖は機能的に重要な役割を果たすことが多く、糖供与体の大量で安価な供給が望まれている。このGDP-L-フコースはGDP-D-マンノースから3段階の反応を経て合成され、これらの3つの反応が2種類の酵素によって触媒されることが報告されている(図1)(Tonettiら、J. Biol. Chem., Vol.271, 27274 (1996))。これらの酵素は、原核生物である大腸菌などから真核生物であるヒトなどの高等哺乳類にいたるまで、フコースを使用するあらゆる生物がもっている普遍的な酵素である。しかし、このような生物は合成したGDP-L-フコースを使用していくため、細胞内にGDP-L-フコースが蓄積することはない。このため、生物体からGDP-L-フコースを単離する場合、その量は極めて低くかつ高価である。また、その合成に長い行程を必要とするため、上記のバクテリアの系を用いる手法においても十分な量を供給することは、現状では困難である。

## 【0007】

この3段階の反応を触媒する酵素は、最初の1段階目の反応であるGDP-D-マンノースから脱水反応を起こしてGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノースに変換する反応を触媒するGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼと、その次の異性化及び還元といった2つの反応を行うGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼの2種類である。植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、最初の反応を触媒するGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼの遺伝子としてMUR1が既に単離されている (Boninら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.94, 2085 (1997))。

## 【0008】

しかしながら、その次の反応を触媒するGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子の単離についてはまだ報告されておらず、遺伝子データベースに他の生物種のGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼと相同性の高い配列が登録されているのみである。

## 【0009】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、GDP-L-フコースを効率良く合成するためのGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子を提供することにある。

## 【0010】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、GDP-D-マンノースからのGDP-L-フコース合成において後半2段階の反応を触媒する、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼをコードする遺伝子 (AtFX遺伝子) を単離し、この遺伝子の塩基配列を明らかにするとともに、該遺伝子を、シロイヌナズナのGDP-L-フコース合成において最初の反応を触媒するMUR1遺伝子とともに共発現させることによって、生体内及び生体外で効率よくGDP-L-フコースが合成されることを

見だし、本発明を完成させるに至った。

【0011】

すなわち、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質を提供する。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

【0012】

さらに、本発明は、以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする DNA を提供する。

(a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

(b) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

前記 DNA は、好ましくは配列番号 2 で表される塩基配列を含む。

【0013】

さらに、本発明は、上記 DNA を含む発現ベクターを提供する。

さらに、本発明は、上記発現ベクターによって形質転換された形質転換体を提供する。このような形質転換体としては、例えば、酵母 W303/pY0-AtFX-Myc 株 (FERM P-17651) が挙げられる。さらに、本発明は、該形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼを採取することを特徴とする GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼの製造方法を提供する。

【0014】

さらに、本発明は、上記発現ベクター及び GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼをコードする DNA を含む発現ベクターによって形質転換された形質転換体を提供する。このような形質転換体としては、例えば、酵母 W303/YEp-MUR1-HA, p

Y0-AtFX-Myc株 (FERM P-17650) が挙げられる。さらに、本発明は、該形質転換体を用いてGDP-D-マンノースをGDP-L-フコースに変換する方法、並びに、該形質転換体を、GDP-D-マンノースと共に培地に培養し、得られる培養物からGDP-L-フコースを採取することを特徴とするGDP-L-フコースの製造方法を提供する。

## 【0015】

## 【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書において、アミノ酸配列及び塩基配列の略号による表示は、IUPAC-IUBの規定及び当該分野における通称又は慣行に従うものとする。

1. GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子の単離

本発明のGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ遺伝子は、一般的手法に従ってシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) から調製したcDNAライブラリを鋳型とし、PCR法により単離することができる。

## 【0016】

シロイヌナズナのcDNAライブラリは、通常用いられているプラスミドベクター、λファージ由来のベクター等を用い、当業者に公知の方法に従って作製することができる。また、市販のシロイヌナズナ由来cDNAライブラリを用いてもよい。

## 【0017】

PCR法は、生体外において、DNAの特定の領域を、そのセンスプライマー及びアンチセンスプライマー、耐熱性のDNAポリメラーゼ、DNA増幅システム等の組み合わせを用いて、約2～3時間で10～100万倍に特異的に増幅することができる技術である。本発明のDNAは、適切なプライマーを用いることにより、PCR法での増幅が可能である。

## 【0018】

上記PCRにおいて用いることのできるプライマーは、他種の酵素遺伝子との



塩基配列の相同性等に基づいて設計することができる。他種の酵素遺伝子の塩基配列としては、GenBank等の公知のDNA配列データベースに登録されているものを用いることができ、これらは、当業者であれば容易に検索することができる。このような塩基配列としては、例えば、GenBankアクセッション番号U38473、U58766、及びAF045286に登録されているものが挙げられる。さらに、プライマーを設計する際には、PCR増幅後に行う遺伝子操作を考慮して、プライマーの塩基配列中に制限酵素部位等の配列を含ませることができる。

## 【0019】

このようにして設計されるプライマーとしては、以下の塩基配列を有するものが挙げられる。

フォワードプライマー：

5'-ATTGGTACCATGTCTGACAAATCTGCCAAAATCTTCGTC-3' (配列番号3)

リバースプライマー：

5'-TTAGTCGACGATATCTCGGTTGCAAACATTCTTCAAATACCAATCATAAG-3' (配列番号4)

## 【0020】

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部分はKpnI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はEcoRV部位を示す。これらのプライマーを用いてPCRを行うことにより、本発明のDNAが良好に増幅することができる。

## 【0021】

PCRを行うためのPCR溶液には、鋳型として用いるcDNAライブラリ及びプライマーの他、耐熱性DNAポリメラーゼ、dNTP混合物等を添加する必要がある、このようなPCR溶液は当業者であれば適切に調製することができるが、例えば、以下の表1に示すような組成とすることができる。

## 【0022】

【表 1】

P C R 溶液の組成	
10×LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 $\mu$ l
フォワードプライマー (20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
リバースプライマー (20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
cDNAライブラリー (1 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
水	33.5 $\mu$ l
合計	50.0 $\mu$ l

## 【0023】

P C Rの条件は、使用するプライマーの塩基配列等に従って、当業者は適切に設定することができるが、例えば、94℃で15秒（変性）、50℃で30秒（アニーリング）及び68℃で2分（伸長）の反応を30サイクルとするとよい。このような反応は、市販のサーマルサイクラー等を用いて容易に行うことができる。

## 【0024】

上記P C Rによって増幅されたDNAは、適切なプラスミド中にクローン化することができる。DNAを組み込むプラスミドとしては、宿主内で複製保持されるものであればいずれも使用することができるが、例えば、大腸菌由来のpBR322やpUC19などを用いることができる。

## 【0025】

また、増幅されたDNAのクローン化は、市販のキットを用いて行うこともでき、このようなキットとしては、例えば、TAクローニングキット（Invitrogen）が挙げられる。市販のキットを用いる場合には、プラスミドとしては、該キットに含まれるものを用いることができる。

## 【0026】

本発明のDNAを含むプラスミドを大腸菌等に組み込む方法としては、例えば、T.Maniatisらの方法[Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 1st Edition, p.250 (1982)]、F. M. Ausubelらの方法[Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition, 1-27 (1999)]等が挙げられる。

## 【0027】

本発明のDNAの塩基配列は、上記のようにして得られるプラスミドを用い、ジデオキシ法等の公知の方法によって決定することができる。このような塩基配列決定は、市販のキットを用いて行うこともでき、このようなキットとしては、例えば、シークエンスキット (PE Biosystems) が挙げられる。さらに、本発明のDNAの塩基配列が決定されると、該塩基配列から、本発明のタンパク質のアミノ酸配列が推定される。

## 【0028】

本発明のタンパク質は、配列番号1に表されるアミノ酸配列を含んでおり、該タンパク質はGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有する。さらに、本発明のタンパク質のアミノ酸配列は配列番号1に表されるものに限定されるものではなく、該タンパク質がGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有する限りにおいて、配列番号1において1個又は複数のアミノ酸残基が置換、欠失、付加、又は挿入されたアミノ酸配列であってもよい。

## 【0029】

本発明のDNAは、上記のような本発明のタンパク質のアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。このような塩基配列としては、1つのアミノ酸に対して複数のコード配列が存在し得ることを考慮すると、多くの塩基配列が考えられるが、例えば、配列番号2に表される塩基配列が挙げられる。配列番号2に表される塩基配列以外の塩基配列を含む本発明のDNAは、部位特異的変異誘発法 (Zollerら, Nucleic Acids Res., Vol. 10, No. 20, 6487-6500 (1982))、化学的合成法等により、当業者であれば容易に調製することができる。

## 【0030】

## 2. 本発明のDNAを発現する発現ベクターの構築

クローン化された本発明のDNAは、発現に適したベクター中のプロモーターの下流に連結して発現ベクターを構築することができる。ベクターとしては、酵母由来のプラスミドYEp352GAP、YEp51、pSH19、pY0325等が挙げられる。

## 【0031】

発現用ベクターに組み込むDNAとしては、本発明のDNAであって、その5'

末端に翻訳開始コドンであるATGを有し、3'末端に翻訳終止コドンであるTAA、TGA又はTAGを有するものを用いる。また、5'末端又は3'末端に、例えばヘマグルチニンタンパク質の一部分である標識抗原遺伝子やGSTタンパク質等の標識タンパク質遺伝子を結合させて発現させてもよい。

## 【0032】

さらに該遺伝子を発現させるためには、その上流にプロモータを接続することが好ましいが、本発明で用いられるプロモータとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応した適切なプロモータであれば、いかなるものでもよい。例えば、形質転換する宿主が酵母である場合には、プロモータとしては、ENO1プロモータ、GAL10プロモータ、GAPDHプロモータ、ADHプロモータ等が挙げられる。

## 【0033】

さらに該遺伝子の転写を終了させるために、その下流にターミネータを接続してもよい。本発明で用いられるターミネータとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応した適切なターミネータであれば、いかなるものでもよい。例えば、形質転換する宿主が酵母である場合には、ターミネータとしては、ENO1ターミネータ、GAL10ターミネータ、GAPDHターミネータ、ADHターミネータ等が挙げられる。

これらの本発明のDNA、プロモータ、ターミネータ等の発現用ベクターへの組込み操作は、当業者であれば適切に行うことができる。

## 【0034】

### 3. 本発明の発現ベクターを保持する形質転換体の作製

上記「2. 本発明のDNAを発現する発現ベクターの構築」の記載に従って構築される本発明の発現ベクターを、適切な宿主に導入することによって、本発明のタンパク質を発現する形質転換体を作製することができる。

## 【0035】

宿主としては、GDP-L-フコースを生体内で消費しないものであればいかなるものでも使用することができ、特に制限されないが、好ましくは酵母を使用する。酵母としては、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) その他の酵母 (*Pichia pastoris* など) 等が挙げられる。また、GDP-L-フコースの生産に酵素抽出物

を用いる場合、すなわち、生体外でGDP-L-フコースを生産する場合、細胞質内で本発明のタンパク質を発現することが可能な宿主であれば、いかなるものでも用いることができる。

【0036】

上記形質転換体の作製は、それぞれの宿主について一般的に行われている方法により行うことができる。例えば、宿主が酵母であれば、リチウム法、エレクトロポレーション法等により、本発明の発現ベクターを導入する。

このようにして得られる形質転換体としては、例えばW303/pY0-AtFX-Myc株（FERM P-17651）を挙げることができる。

【0037】

さらに、形質転換体の培養によりGDP-L-フコースの生産を行うためには、宿主は、あらかじめGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターで形質転換されているか、あるいは本来GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現しているものである必要がある。GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼ遺伝子としては、好ましくはシロイヌナズナ由来のMUR1遺伝子を用いる。

【0038】

GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターは、本発明のタンパク質を発現する発現ベクターについて上述した方法に従って、構築することができる。ただし、GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼをコードするDNAをクローニングする際のPCRにおいて使用するプライマーは、GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼ遺伝子の公知の塩基配列の比較等により設計したものを用いる必要があるが、例えば、以下の塩基配列を有するプライマーを用いることができる。

【0039】

フォワードプライマー：

5'-GTCGAATTCATGGCGTCAGAGAACAAC-3'（配列番号5）

リバースプライマー：

5'-GAACTCGAGAGGTTGCTGCTTAGCATC-3'（配列番号6）

【0040】

上記のような、GDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターが導入された形質転換体としては、例えばW303/YEp-MUR1-HA株（FERM P-17649）が挙げられる。さらに、このような形質転換体に本発明の発現ベクターを導入した形質転換体としては、例えば、W303/YEp-MUR1-HA,pY0-AtFX-Myc株（FERM P-17650）が挙げられる。

## 【0041】

なお、上述のW303/pY0-AtFX-Myc株、W303/YEp-MUR1-HA株、及びW303/YEp-MUR1-HA,pY0-AtFX-Myc株は、それぞれFERM P-17651、FERM P-17649、及びFERM P-17650の受託番号で、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている。

## 【0042】

## 4. 本発明の形質転換体の培養による本発明のタンパク質の生産

本発明の形質転換体、すなわち本発明の発現ベクターを導入したもの（例えば、W303/pY0-AtFX-Myc株）、又はGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターがさらに導入されている形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA,pY0-AtFX-Myc株）を適切な培地に培養し、得られる培養物から本発明のタンパク質、すなわちGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼを単離することができる。

## 【0043】

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法によって行うことができる。大腸菌や酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

## 【0044】

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸類、及び又はエタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸ア

ンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。

## 【0045】

無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

特に、酵母を培養するための培地としては、例えば、YPD培地、SD培地等が挙げられる。

## 【0046】

微生物を宿主として得られた形質転換体の培養は、好ましくは、25～37℃で12時間～5日間行い、必要により通気や攪拌を行うことができる。pHは通常用いられる範囲であればよく、特に制限されないが、好ましくは5.0～7.5、より好ましくは約7.5に保持する。pHの調整は、無機酸又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は必要に応じてアンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を培地に加えてもよい。プロモーターとして誘導性プロモーターを有する発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。

## 【0047】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地にウシ胎児血清等を添加した培地が用いられる。植物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ及びスクーグ(MS)の培地が用いられる。

## 【0048】

動物細胞を宿主として得られた形質転換体の培養は、通常、5%CO<sub>2</sub>存在下、約37℃で1～2日間行う。培養中は、必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

## 【0049】

培養後、本発明のタンパク質を培養物から採取する。該酵素が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎等することにより、該酵素を採取することができる。また、該酵素が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用して、又は遠心分離等により菌体若しくは細胞を除去した後、該酵素を採取することができる。該酵素の採取は、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等を、単独で又は適宜組合せて用いることにより行うことができる。

以上のようにして得られたタンパク質が本発明のタンパク質であることの確認は、一般的な酵素化学反応、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動等の電気泳動法、抗原抗体反応等の免疫学的方法などにより行うことができる。

#### 【 0 0 5 0 】

##### 5. GDP-L-フコースの生産

GDP-L-フコースの生産は、本発明の形質転換体を培養することにより、又はGDP-L-フコース製造に必要な酵素源を用いる酵素反応により行うことができる。

#### 【 0 0 5 1 】

##### (1) 本発明の形質転換体の培養によるGDP-L-フコースの生産

本発明の発現ベクター及びGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼを発現する発現ベクターの双方が導入されている形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA, pYO-AtFX-Myc株）を、GDP-D-マンノースと共に適切な培地に培養し、得られる培養物からGDP-L-フコースを単離・精製することができる。

形質転換体を培養する際の培地、温度、培養期間、pHその他の条件は、上記「4. 本発明の形質転換体の培養による本発明のタンパク質の生産」に記載したとおりである。また、必要に応じてNADPH等の補助因子を培地に添加してもよい。

#### 【 0 0 5 2 】

上記培養物からのGDP-L-フコースの抽出は、宿主細胞を遠心分離によって培地と分け、宿主細胞を破碎して、さらに遠心分離することにより行うことができる。宿主が酵母である場合、例えばガラスビーズによって細胞を破壊し、遠心分離によって、GDP-L-フコースを含む上清画分を得ることができる。



## 【 0 0 5 3 】

上記の上清画分からのGDP-L-フコースの単離・精製は、当業者であれば容易に行うことができるが、例えば、ゲルろ過法により低分子量の画分を集め、さらにHPLCによる分離を行うことにより行うことができる。ここで用いるゲルろ過用ゲル、カラムのサイズ及び溶離液、並びにHPLC用カラム及び溶離液等は、当業者であれば適切に選択することができる。

## 【 0 0 5 4 】

## (2) 酵素源を用いる酵素反応によるGDP-L-フコースの生産

GDP-L-フコースの生産は、必要な酵素を含む酵素源を用いる酵素反応によっても行うことができる。

酵素反応の基質としてGDP-D-マンノースを用いる場合には、必要となる酵素はGDP-D-マンノース-4,6-デヒドラターゼ及びGDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ（本発明のタンパク質）である。これらの酵素は、それぞれを発現する形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA株及びW303/pY0-AtFX-Myc株）を培地に培養して別個に発現させ、その後に混合して用いてもよいが、好ましくは、これらの酵素の双方を発現する形質転換体（例えば、W303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc株）を培地に培養して発現させる。形質転換体の培養物からのこれらの酵素の単離は、上記「4. 本発明の形質転換体の培養による本発明のタンパク質の生産」に記載されている方法により行うことができる。また、上記の酵素反応に用いる酵素源は、精製酵素である必要はなく、上記形質転換体の細胞内抽出液等の粗抽出物であってもよい。

## 【 0 0 5 5 】

上記酵素源及び基質となるGDP-D-マンノースを含む反応液を調製し、適切な条件下で酵素反応を行うことができる。該反応液には、必要に応じて、NADPH等の補助因子を添加してもよい。反応条件は、当業者であれば適切に設定することができるため、特に制限されないが、温度は、好ましくは30℃～37℃、より好ましくは約37℃とし、pHは、好ましくは6.0～8.0、より好ましくは約7.5とする。pHを所望の範囲に保持するためには、Tris-HCl等の緩衝液を用いることができる。

## 【0056】

酵素反応液からのGDP-L-フコースの単離は、当業者であれば容易に行うことができる。例えば、酵素反応液中のタンパク質を熱変性させ、これを遠心分離、メンブレンフィルター等を用いて除去した後に、HPLCによりGDP-L-フコースを単離精製することができる。

該GDP-L-フコースはフコース含有糖鎖の合成の際に糖供与体として必須なものである。機能的に重要と思われる糖鎖へのフコース付加の際に有用なものである。

## 【0057】

## 【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明をより具体的に説明する。ただし、これらの実施例は説明のためのものであり、本発明の技術的範囲を制限するものではない。

## 【実施例1】 AtFX遺伝子の単離及び配列決定

シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の cDNA ライブラリを用いて、PCR法によるAtFX遺伝子のクローニングを行った。cDNAライブラリとしては、QUICK-Clone cDNA (CLONTECH社) を用いた。

## 【0058】

プライマーは、データベース上に登録されている塩基配列 (DB名: GenBank; アクセッション番号: U38473、U58766、及びAF045286) に基づいて設計した。その際に、タンパク質をコードしている部分が制限酵素を用いて容易に切り出せるとともに、標識抗原遺伝子等が簡単に挿入できるように、N-末端部分にKpnI部位、C-末端部分にEcoRV部位をあらかじめ含んだプライマーを設計した。それぞれのプライマーの塩基配列を以下に示す。

## 【0059】

フォワードプライマー:

5'-ATTGGTACCATGTCTGACAAATCTGCCAAAATCTTCGTC-3' (配列番号3)

リバースプライマー:

5'-TTAGTCGACGATATCTCGGTTGCAAACATTCTCAAATACCAATCATAAG-3' (配列番号4)

## 【0060】

ここで、フォワードプライマーの塩基配列中の下線部分はKpnI部位を示し、リバースプライマーの塩基配列中の下線部分はEcoRV部位を示す。このようにして設計したプライマーは、常法により合成した。

上記QUICK-Clone cDNA (CLONTECH社) を鋳型として用い、上記のプライマーを使用してPCRを行った。PCR溶液の組成は以下の表2に示す。

【0061】

【表2】

PCR溶液の組成

10×LA PCR Buffer II (Mg <sup>2+</sup> plus)	5 $\mu$ l
dNTP Mixture (各 2.5 mM)	8 $\mu$ l
フォワードプライマー (20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
リバースプライマー (20pmol/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
cDNAライブラリー (1 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TaKaRa LA Taq (5 U/ $\mu$ l)	0.5 $\mu$ l
水	33.5 $\mu$ l
合計	50.0 $\mu$ l

【0062】

また、PCRの温度条件は、94℃で15秒（変性）、50℃で30秒（アニーリング）及び68℃で2分（伸長）の反応を30サイクルとした。

このPCRによって得られた約1 kbpのDNA増幅断片を、アガロース電気泳動で分離した後、TAクローニングキット (Invitrogen) を用いてpCR2.1ベクターに挿入した。このクローニングされたDNAの塩基配列を、ダイデオキシ法を用いるシーケンスキット (PE Biosystems) により決定した。この塩基配列を配列番号2に、該塩基配列によってコードされるアミノ酸配列を配列番号1に示す。

【0063】

〔実施例2〕 AtFX遺伝子発現ベクター及びMUR1遺伝子発現ベクターの作製、並びにこれらのプラスミドを含む酵母形質転換体の作製

pCR2.1ベクターに挿入されているAtFX遺伝子のEcoRV部位に、標識抗原をコードする3xMyc遺伝子 (Evanら、Mol. Cell Biol., Vol.5, 3610 (1985)) を、AtFX遺伝子とフレームが合うように挿入した。このMyc遺伝子を含むAtFX遺伝子をKpn

I-XhoIで切り出し、この断片を、酵母の発現ベクターYEp352GAP (Royら、J. Biol. Chem., Vol.273, 2583 (1998)) のマルチクローニング部位をpUC18のマルチクローニング部位のうちのEcoRIからSalIまでの部分でさしかえた発現用ベクターYEp352GAP-IIのKpnI-SalI部位に挿入した。さらにこのベクターからGAPDHプロモータ、AtFX-Myc、GAPDHターミネータの3つの部分を含む断片をBamHIを用いて切り出し、該断片を、LUE2マーカーを持つ酵母の多コピーベクターpY0325 (Qadotaら、Yeast, Vol.8, 735 (1992)) のBamHI部位に挿入し、AtFX遺伝子発現ベクターpY0-AtFX-Mycを構築した。

MUR1遺伝子もまた、実施例1と同様にPCRを用いてクローニングした。ただし、PCR用プライマーとしては、以下の塩基配列を有するプライマーを用いた。

#### 【0064】

フォワードプライマー：

5'-GTCGAATTCATGGCGTCAGAGAACAAC-3' (配列番号5)

リバースプライマー：

5'-GAACTCGAGAGGTTGCTTGCTTAGCATC-3' (配列番号6)

#### 【0065】

次いで、MUR1遺伝子をYEp352GAPベクター (Royら、J. Biol. Chem., Vol.273, 2583 (1998)) のEcoRI部位に挿入し、さらにインフレームになるように3xHA標識抗原遺伝子をPvuII部位に挿入してMUR1遺伝子発現ベクターYEp-MUR1-HAを構築した。

#### 【0066】

これらの発現ベクターは、それぞれ単独で又は2つ一緒に酵母のW303-1A株(ur a3, lue2, his3, trp1, ade2) (Kainumaら、Glycobiology, Vol.9, 133 (1999)) に形質転換し、pY0-AtFX-Mycのみを含むW303/pY0-AtFX-Myc株、YEp-MUR1-HAのみを含むW303/YEp-MUR1-HA株、及びpY0-AtFX-MycとYEp-MUR1-HAの双方を含むW303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc株を得た。

#### 【0067】

〔実施例3〕 MUR1タンパク質及びAtFXタンパク質の酵母内での発現

実施例 2 で得られた形質転換体について、それぞれの細胞内でタンパク質が発現されるかどうかを、ウエスタンブロッティングを用いて確認した。

まず、上記形質転換体 (W303/YEp-MUR1-HA株、W303/pY0-AtFX-Myc株、及びW303/YEp-MUR1-HA,pY0-AtFX-Myc株) 及びW303株のそれぞれをSD培地上にて30℃で24時間培養し、得られた酵母細胞をガラスビーズで破碎した。得られた破碎物を遠心操作 (100,000×g、4℃、60分間) することにより細胞質画分だけを分離し、75%硫酸アンモニウムでタンパク質画分だけを沈降させた。このタンパク質沈殿画分を、0.5mM DTTを含む20mM Tris-HCl (pH7.5) に溶かし、Sephadex G50 (Pharmacia、0.5mM DTTを含む20mM Tris-HCl,pH7.5、1.3cm×2.6cm) で脱塩することにより酵素液を得た。該酵素液について、BCAキット (RIERCE) を用いてタンパク質定量を行った。それぞれタンパク質100μgに相当する酵素液をとってSDS-PAGEを行った後、PVDF膜に電氣的に転写し、それぞれ、HA抗体若しくはMyc抗体を用いてタンパク質の発現を確認した (図2)。

その結果、W303/YEp-MUR1-HA株及びW303/YEp-MUR1-HA,pY0-AtFX-Myc株ではMUR1タンパク質が、W303/pY0-AtFX-Myc株及びW303/YEp-MUR1-HA,pY0-AtFX-Myc株ではAtFXタンパク質が発現していることが確かめられた。

【0068】

#### 〔実施例4〕GDP-L-フコース合成活性測定

GDP-L-フコース合成活性測定は、実施例3で調製した各酵素液について、基質としてGDP-D-マンノースを、補助因子として50mM NADPHを用いて行った。まず、50mM NADPHを含有する緩衝液 (10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM EDTA) 50μlにGDP-D-マンノース50nmolを添加し、これにタンパク質700μgに相当する各酵素液を加えて、37℃で1時間インキュベートした。次いで、この反応液を100℃で3分間沸騰させた後、沈殿した変性タンパク質を、10,000rpmで5分間遠心して取り除き、上清をウルトラフリー (0.20μm) で分子量10,000以上のものを取り除き、HPLCによりGDP-L-フコースとGDP-D-マンノースの測定を行った。HPLCはC18カラム (wakosil 5C18-200、和光純薬工業、直径0.46cm×長さ25cm) を用いて0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>水溶液を1ml/minで流して分離を行った。

【0069】

その結果、MUR1タンパク質とAtFXタンパク質を共発現させたW303/YEp-MUR1-HA, pY0-AtFX-Myc株のみでGDP-L-フコース合成活性を検出した(図3)。MUR1タンパク質のみではなんの活性も示さず、酵母で単独発現させた場合、活性が保たれていないことが分かった。このことは、GDP-L-フコースを合成する場合、AtFXタンパク質は、MUR1タンパク質による第1段階の反応の後にGDP-L-フコースを完成させるだけではなく、MUR1タンパク質の活性型を安定化する作用もあることが明らかとなった。

【0070】

【発明の効果】

本発明により、糖鎖において非常に重要な機能をもつフコースの付加を行うために必須であるGDP-L-フコースを、多量に効率よく生産することができる。現時点において糖タンパク質糖鎖を均一に合成する技術は確立されておらず、最終的には生体外での糖鎖の修飾を行うことで糖鎖の均一な合成を行うことが考えられるが、この際、糖供与体として糖ヌクレオチドは必須なものである。特に、フコースにおいてはGDP-L-フコースが大変高価なため、生体外での修飾反応を大量に行うことは非現実的であるが、本発明により多量のGDP-L-フコースの供給が可能となれば、フコースの付加した高機能な糖鎖の合成を生体外で行うことができる。

【0071】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> A GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3,5-epimerase-4-reductase

Gene From Arabidopsis Thaliana

<130> 11900303

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 312

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ser Asp Lys Ser Ala Lys Ile Phe Val Ala Gly His Arg Gly Leu

1                      5                      10                      15

Val Gly Ser Ala Ile Val Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gly Phe Thr Asn

20                      25                      30

Leu Val Leu Lys Thr His Ala Glu Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala Asp

35                      40                      45

Val Glu Ser Phe Phe Ser Gln Glu Lys Pro Val Tyr Val Ile Leu Ala

50                      55                      60

Ala Ala Lys Val Gly Gly Ile His Ala Asn Asn Thr Tyr Pro Ala Asp

65                      70                      75                      80

Phe Ile Gly Val Asn Leu Gln Ile Gln Thr Asn Val Ile His Ser Ala

85                      90                      95

Tyr Glu His Gly Val Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Ser Cys Ile

100

105

110

Tyr Pro Lys Phe Ala Pro Gln Pro Ile Pro Glu Ser Ala Leu Leu Thr

115

120

125

Ala Ser Leu Glu Pro Thr Asn Glu Trp Tyr Ala Ile Ala Lys Ile Ala

130

135

140

Gly Ile Lys Thr Cys Gln Ala Tyr Arg Ile Gln His Gly Trp Asp Ala

145

150

155

160

Ile Ser Gly Met Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Pro Asn Asp Asn Phe His

165

170

175

Pro Glu Asn Ser His Val Leu Pro Ala Leu Met Arg Arg Phe His Glu

180

185

190

Ala Lys Val Asn Gly Ala Glu Glu Val Val Val Trp Gly Thr Gly Ser

195

200

205

Pro Leu Arg Glu Phe Leu His Val Asp Asp Leu Ala Asp Ala Cys Val

210

215

220

Phe Leu Leu Asp Arg Tyr Ser Gly Leu Glu His Val Asn Ile Gly Ser

225

230

235

240

Gly Gln Glu Val Thr Ile Arg Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Glu Val



245

250

255

Val Gly Phe Glu Gly Lys Leu Gly Trp Asp Cys Thr Lys Pro Asp Gly

260

265

270

Thr Pro Arg Lys Leu Met Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Leu Gly Trp

275

280

285

Thr Pro Lys Val Ser Leu Arg Asp Gly Leu Ser Gln Thr Tyr Asp Trp

290

295

300

Tyr Leu Lys Asn Val Cys Asn Arg

305

310

<210> 2

<211> 936

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(936)

<400> 2

atg tct gac aaa tct gcc aaa atc ttc gtc gcg ggt cat cgt ggt ttg 48

Met Ser Asp Lys Ser Ala Lys Ile Phe Val Ala Gly His Arg Gly Leu

1

5

10

15

gtt gga tct gcc att gtc cgc aag ctt cag gaa caa ggt ttc acc aat 96

Val Gly Ser Ala Ile Val Arg Lys Leu Gln Glu Gln Gly Phe Thr Asn

20

25

30

ctc gtt ctt aaa aca cac gcc gag ctt gat ctc act cgt caa gcc gat 144

Leu Val Leu Lys Thr His Ala Glu Leu Asp Leu Thr Arg Gln Ala Asp

35

40

45

gtt gaa tcc ttc ttt tct caa gag aag cca gtt tat gta atc cta gca 192

Val Glu Ser Phe Phe Ser Gln Glu Lys Pro Val Tyr Val Ile Leu Ala

50

55

60

gca gct aaa gtt ggt ggt att cac gct aac aac acc tat cct gct gat 240

Ala Ala Lys Val Gly Gly Ile His Ala Asn Asn Thr Tyr Pro Ala Asp

65

70

75

80

ttc att ggt gtc aat ctc cag att cag acc aat gtg atc cac tct gca 288

Phe Ile Gly Val Asn Leu Gln Ile Gln Thr Asn Val Ile His Ser Ala

85

90

95

tat gag cac ggt gtg aag aag ctt ctc ttc ctt gga tca tcc tgc att 336

Tyr Glu His Gly Val Lys Lys Leu Leu Phe Leu Gly Ser Ser Cys Ile

100

105

110

tac cct aaa ttt gct cct cag cca att cct gag tct gct ttg tta aca 384

Tyr Pro Lys Phe Ala Pro Gln Pro Ile Pro Glu Ser Ala Leu Leu Thr

115

120

125

gca tcg ctt gaa cca act aat gag tgg tat gct att gct aag atc gct 432

Ala Ser Leu Glu Pro Thr Asn Glu Trp Tyr Ala Ile Ala Lys Ile Ala

130	135	140	
ggg att aag act tgt cag gct tat agg att cag cac gga tgg gat gca			480
Gly Ile Lys Thr Cys Gln Ala Tyr Arg Ile Gln His Gly Trp Asp Ala			
145	150	155	160
atc tct ggc atg cct act aat ctc tat ggt cct aat gac aat ttc cac			528
Ile Ser Gly Met Pro Thr Asn Leu Tyr Gly Pro Asn Asp Asn Phe His			
	165	170	175
ccg gag aat tct cat gtg ctt cct gct ctt atg agg agg ttc cac gag			576
Pro Glu Asn Ser His Val Leu Pro Ala Leu Met Arg Arg Phe His Glu			
	180	185	190
gcg aaa gtg aat gga gcg gag gaa gtt gtg gtg tgg ggt aca ggt agt			624
Ala Lys Val Asn Gly Ala Glu Glu Val Val Val Trp Gly Thr Gly Ser			
	195	200	205
ccg ttg agg gag ttc ttg cat gtt gat gat ttg gct gat gct tgt gtt			672
Pro Leu Arg Glu Phe Leu His Val Asp Asp Leu Ala Asp Ala Cys Val			
	210	215	220
ttc ttg ctg gat cga tac agc ggg ttg gag cat gtt aac att gga agt			720
Phe Leu Leu Asp Arg Tyr Ser Gly Leu Glu His Val Asn Ile Gly Ser			
225	230	235	240
ggt caa gaa gtg act att aga gag ttg gct gag ttg gtg aaa gag gtt			768
Gly Gln Glu Val Thr Ile Arg Glu Leu Ala Glu Leu Val Lys Glu Val			
	245	250	255

gtt ggt ttt gaa ggg aag ctt gga tgg gat tgc act aag cca gat ggc 816

Val Gly Phe Glu Gly Lys Leu Gly Trp Asp Cys Thr Lys Pro Asp Gly

260

265

270

aca ccg agg aaa ctt atg gac agc tca aag ctc gcg tct ttg ggt tgg 864

Thr Pro Arg Lys Leu Met Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Leu Gly Trp

275

280

285

aca cct aag gtt tct ctt aga gat ggt ctg agc caa act tat gat tgg 912

Thr Pro Lys Val Ser Leu Arg Asp Gly Leu Ser Gln Thr Tyr Asp Trp

290

295

300

tat ttg aag aat gtt tgc aac cga

936

Tyr Leu Lys Asn Val Cys Asn Arg

305

310

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

attggtacca tgtctgacaa atctgccaaa atcttcgtc

39

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

ttagtcgacg atatctcggt tgcaaacatt cttcaaatac caatcataag 50

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 5

gtcgaattca tggcgtcaga gaacaac 27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 6

gaactcgaga ggttgctgct tagcatc

27

【 0 0 7 2 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 3 ～ 6 : プライマー

【図面の簡単な説明】

【図 1】

GDP-D-マンノースからGDP-L-フコースへの酵素反応過程を示す図である。

【図 2】

ウエスタンブロッティングによるMUR1及びAtFXタンパク質の発現を示す電気泳動写真である。

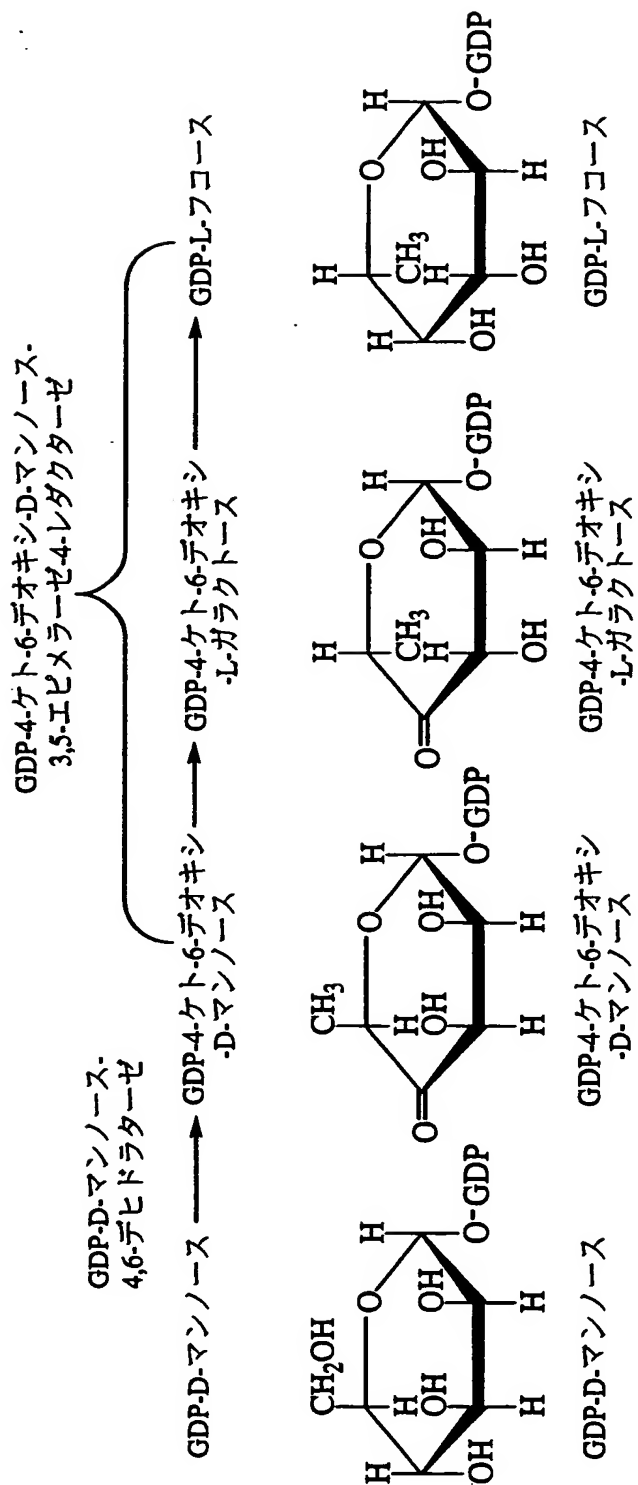
【図 3】

HPLCによるGDP-L-フコース合成活性の測定結果を示すクロマトグラムである。

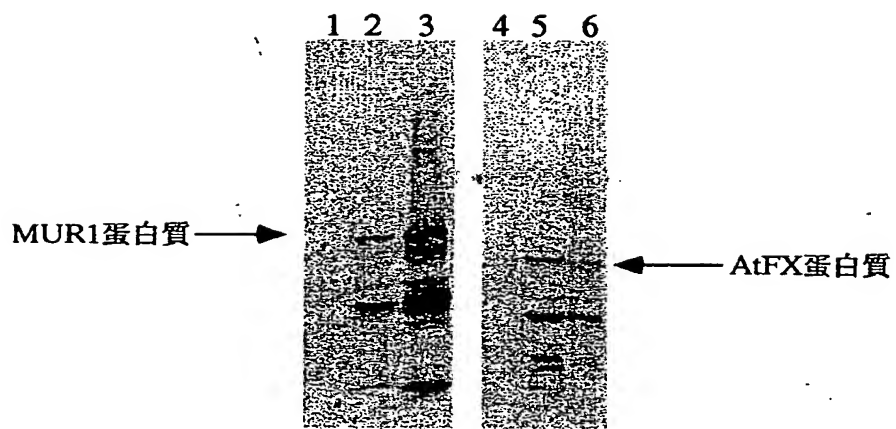
【書類名】

図面

【図 1】



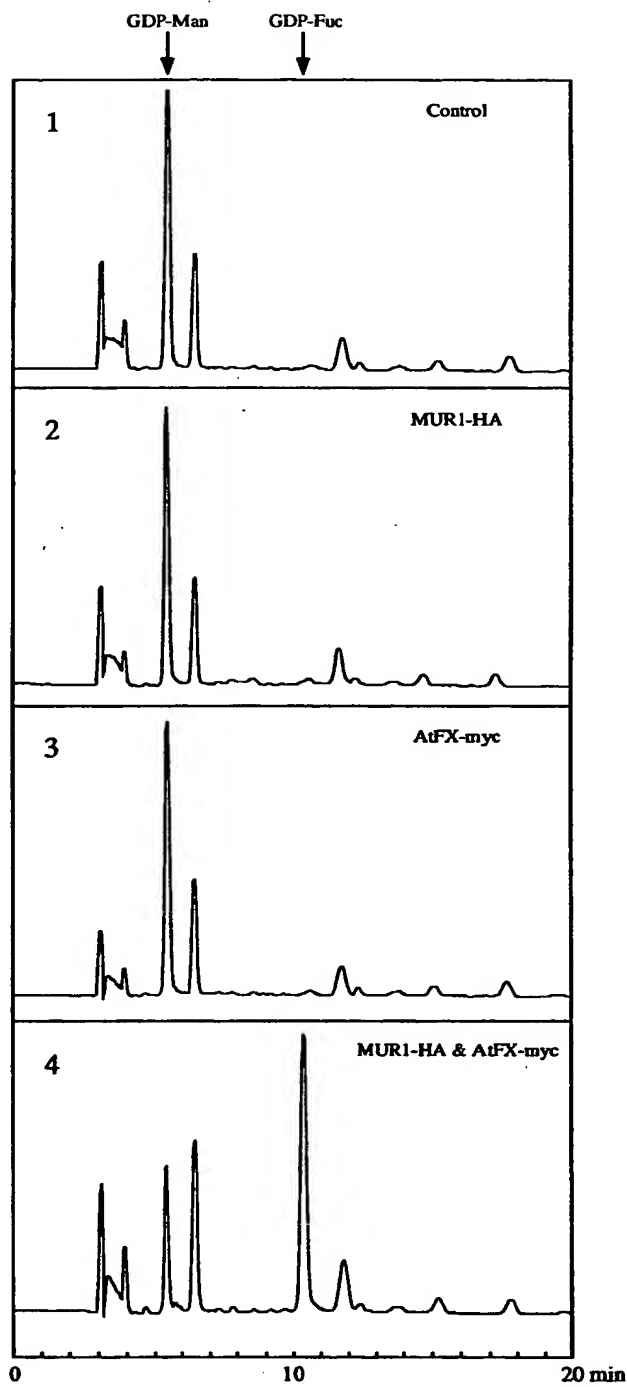
【図 2】



1, 4 ; W303株  
2 ; MUR1単独発現株  
5 ; AtFX単独発現株  
3, 6 ; MUR1およびAtFX共発現株



【図 3】



- 1; W303株  
 2; MUR1単独発現株  
 3; AtFX単独発現株  
 4; MUR1およびAtFX共発現株

【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 以下の（a）又は（b）のタンパク質。

（a）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質。

（b）配列番号 1 で表されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換、付加若しくは挿入されたアミノ酸配列を含み、かつ GDP-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3,5-エピメラーゼ-4-レダクターゼ活性を有するタンパク質。

【効果】 本発明により、糖鎖において非常に重要な機能をもつフコースの付加を行うために必須である GDP-L-フコースを、多量に効率よく生産することができる。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第329045号
受付番号	59901131228
書類名	特許願
担当官	宇留間 久雄 7277
作成日	平成12年 1月 7日

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】

000001144

【住所又は居所】

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

【氏名又は名称】

工業技術院長

【指定代理人】

申請人

【識別番号】

220000404

【住所又は居所】

茨城県つくば市東1-1-3

【氏名又は名称】

工業技術院生命工学工業技術研究所長

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001144]

1. 変更年月日 1990年 9月20日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

氏 名 工業技術院長